

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-057236

(43)Date of publication of application : 26.02.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/53

G01N 37/00

(21)Application number : 2001-243930

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL
RES
THK CO LTD

(22)Date of filing : 10.08.2001

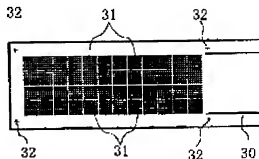
(72)Inventor : TASHIRO HIDEO
KITSUNAI TOKUJI
KONDO YASUMITSU
SHIRAI TAKEKI
NAKAZAWA TOJI
IIMURA AKIHIRO

(54) METHOD FOR MANUFACTURING BIOMOLECULE MICROARRAY AND SPOT APPARATUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and an apparatus for manufacturing a quantitative biomolecule microarray which accurately spots a solution containing probe biomolecules to solid-phase parts for receiving the probe biomolecules.

SOLUTION: A substrate with a plurality of the solid-phase parts for receiving the probe biomolecules (referred to as solid-phase parts, in the following), capable of specifically and quantitatively receiving the probe biomolecules in their surfaces is prepared. The solution containing the probe biomolecules is spotted to the solid-phase parts, and the probe biomolecules contained in the solution are immobilized to the solid-phase parts (the spotting of the solution is performed, in such a way that all the surface of one solid-phase part is covered with one droplet of the solution, and the one droplet contains the number of the probe biomolecules that the one solid-phase part is capable of receiving or more) in the method for manufacturing the biomolecule microarray and the apparatus used for the method. The substrate comprises alignment marks in its surface for the positioning of the substrate. The solid-phase parts are positioned with location relation to the alignment marks. The spotting of the solution is performed to the solid-phase parts positioned with locational relation to the alignment marks.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
			D
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2001-243930(P2001-243930)

(22) 出願日 平成13年8月10日 (2001. 8. 10)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許
出願 (産業再生法第30条の適用を受けるもの)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

(71) 出願人 390029805

T H K 株式会社

東京都品川区西五反田 3 丁目 11 番 6 号

(72) 発明者 田代 英夫

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内

(74) 代理人 100092635

弁理士 塩澤 寿夫 (外 2 名)

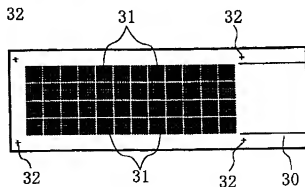
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子マイクロアレイの製造方法及びスポット装置

(57) 【要約】

【課題】プローブ生体分子受容固相部に対して精度良く
プローブ生体分子含有溶液をスポットして定量性のある
生体分子マイクロアレイの製造方法及び装置の提供。

【解決手段】表面にプローブ生体分子を特異的にかつ定量的に受容し得るプローブ生体分子受容固相部 (以下、固相部) を複数個有する基板を準備し、前記固相部にプローブ生体分子含有溶液をスポットし、該溶液に含まれるプローブ生体分子を前記固相部に固定化する (前記溶液のスポットは、前記溶液の 1 つの液滴が前記 1 つの固相部の全面を覆うように行い、かつ 1 つの液滴には 1 つの固相部が受容し得る以上の数のプローブ生体分子が含まれる) 生体分子マイクロアレイの製造方法及びこの方法に使用する装置。前記基板は表面に基板の位置決めをするためのアラインメントマークを有し、前記固相部は、前記アラインメントマークとの位置関係により位置決めされており、かつ前記溶液のスポットは、前記アラインメントマークとの位置関係により位置決めされた固相部に対して行われる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】表面にプローブ生体分子受容固相部を複数個有する基板を準備する工程（但し、前記各プローブ生体分子受容固相部は、プローブ生体分子を特異的にかつ定量的に受容し得る部分である）、及び前記プローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子を含む溶液をスポットし、該溶液に含まれるプローブ生体分子を前記プローブ生体分子受容固相部に固定化する工程（但し、前記溶液のスポットは、前記溶液の 1 つの液滴が前記 1 つの

プローブ生体分子受容固相部の少なくとも 1 つの位置を覆うように行い、かつ前記 1 つの液滴には 1 つのプローブ生体分子受容固相部を受容し得る以上の数のプローブ生体分子が含まれる）、を含む、生体分子マイクロアレイの製造方法であって、

前記基板は表面に基板の位置決めをするためのアラインメントマークを有し、前記プローブ生体分子受容固相部は、前記アラインメントマークとの位置関係により位置決めされており、かつ前記溶液のスポットは、前記アラインメントマークとの位置関係により位置決めされた前記プローブ生体分子受容固相部に対して行われる製造方法。

【請求項 2】前記アラインメントマークを CCD カメラにより読み取り、該読み取りによりスポット手段に基板表面のプローブ生体分子受容固相部の位置を認識させ、位置を認識させたスポット手段により、プローブ生体分子を含む溶液をスポットする請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】前記プローブ生体分子は、DNA、RNA、PNA またはタンパク質であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】生体分子マイクロアレイ用基板上のアラインメントマーク読み取り用の CCD カメラ、該 CCD カメラで読み取られたアラインメントマークの位置からプローブ生体分子受容固相部の位置を認識する機構、及び前記機構により位置認識されたプローブ生体分子受容固相部にスポット手段からプローブ生体分子を含む溶液をスポットさせるための位置制御機構を有するスポット機構を有するプローブ生体分子を含む溶液のスポット装置。

【請求項 5】生体分子マイクロアレイ用基板を整列させるためのテーブルとプローブ生体分子を含む溶液をスポットするためのチップを保持するためのチップホルダーをさらに有し、前記チップホルダーはチップホルダー位置補正回転機構（θ 軸）を介して、X 軸、Y 軸及び Z 軸の各移動装置に接続されている請求項 4 に記載のスポット装置。

【請求項 6】チップホルダー位置補正回転機構（θ 軸）近傍に基板読み取りカメラと、スタンブ観察装置とをさらに有する請求項 4 または 5 に記載のスポット装置。

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、スポット型の生体分子マイクロアレイの製造方法に関する。特に本発明は、検出すべきターゲット生体分子に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖の生体分子、または検出すべきターゲット生体分子と相互作用を有する一本鎖の生体分子をプローブとし、当該プローブ生体分子と生体由来の試料核酸とのハイブリダイゼーションまたは相互作用により形成される二本鎖の有無を検出することによってターゲット生体分子を検出する生体分子検出技術に属する。

【0002】

【従来の技術】生体由来の試料中に存在する生体分子（DNA、RNA など）を検出するためのデバイスとして DNA マイクロアレイ（DNA チップともよばれる）がある。DNA マイクロアレイによれば、数百～数万回分の生体分子検出処理もしくは塩基配列決定処理を一括して並列的に行うことが可能である。DNA マイクロアレイは、数平方センチメートル～数十平方センチメートルのガラス基板やシリコン基板上に数百～数万の DNA 検出ポイント（スポット部）を整然と配置してなる。それぞれの DNA 検出ポイントには予め既知の塩基配列を持った一本鎖の核酸ポリマー（遺伝子断片）がプローブ（検出子）として種類ずつ固定されている。つまり、DNA マイクロアレイ上にはたくさんの種類の核酸プローブが整列している。この DNA マイクロアレイ上に、蛍光物質でラベリング（標識）した試料核酸の水溶液を流すと、試料核酸中の核酸の塩基配列がプローブと相補的である場合のみ両者がハイブリダイズし、洗浄後も、DNA マイクロアレイ上にプローブとハイブリダイズしたターゲット核酸だけが残存する。DNA マイクロアレイ上に残存したターゲット核酸に標識された蛍光物質が発する蛍光を検出することにより、試料核酸中にターゲット核酸が存在するかどうかを判定できる。

【0003】DNA マイクロアレイは、製造法によってフォトリソグラフィ型とスポット型との 2 種類に大別できる。フォトリソグラフィ型では、半導体集積回路の製造プロセスで用いられるフォトリソグラフィによって基板（あるいはシート）上で所望の多種類の DNA（オリゴヌクレオチド）を合成する製造方法がとられ、高密度の DNA 検出ポイントを有する DNA マイクロアレイが実用化されている（米国特許 5744305、5445934 等参照）。一方、スポット型では、固相化剤（ポリリジンまたはアミノシラン）をスライドガラスの全面にコーティングした基板（あるいはシート）を用い、その基板上に、あらかじめ調製したプローブ DNA を含む液滴を一つ一つスポットして載せた後、乾燥させることにより、DNA 検出スポットを形成する製造方法がとられる（米国特許 587522、特表平 10-503841 号等参照）。

【発明が解決しようとする課題】上述した２種類のDNAマイクロアレイには、以下のような特性の違いがある。フォトリソグラフィ型のDNAマイクロアレイは、DNA検出ポイントを細かくでき、DNAを均一に生やすことができるため、高い測定感度とその再現性を保証できる点、SNP（一塩基多型）分析に使用できる点で優れている。しかしながら、マスクは１塩基合成するために１枚必要であり、塩基はA、T、G、Cと４種類あるため、少なくとも４枚のマスクが必要となる。たとえば20塩基の長さのプローブを合成するには80枚のマスクが必要である。マスクは１枚数十万円と高価であり、DNAマイクロアレイを作るためには数千万円の費用がかかる。このため、一部の研究機関でしか使用されていないのが現状である。

【0005】スポットティング型のDNAマイクロアレイは、プローブDNAを含む液滴を基板上に載せて乾かす方法を用いる。そのため安価に作成できるという利点がある反面、基板上に固定されるDNAの密度と均一さが保証されないという欠点がある。すなわち、DNA検出スポット部の寸法や形状が不均一になるため、各DNA検出スポット部に固定されているDNA量にばらつきが生じる。このためスポットティング型のDNAマイクロアレイは、定性的な解析には使用できても、定量的な解析には向いていなかった。すなわち、ターゲット生体分子とのハイブリダイゼーションが生じたDNA検出スポット部の有無は検出できても、各DNA検出スポット部でハイブリダイゼーションしたターゲット生体分子の量を測定することはできなかった。また、ある程度の定量性を実現するためには参照サンプルを内部標準として同時にハイブリダイズさせる必要があった。さらに、スポットティング型のDNAマイクロアレイの場合、DNA検出スポット部の周囲に付着した固相化剤の存在により、ターゲットDNAが非特異的に基板上に吸着し、ノイズの上昇を引き起こし、S/N比を低下させるという問題も有った。

【0006】そこで本発明者らは、定量的な解析に使用でき、かつS/N比の高いスポットティング型の生体分子マイクロアレイを提供することを目的として、先に、核酸等のプローブ生体分子を定量的に受容し、固定化し得るプローブ生体分子受容固相部を有する生体分子マイクロアレイ用基板を開発した。この基板のプローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子を含む溶液をスポットすることで、所定量のプローブ生体分子を検出スポットに固定化された生体分子マイクロアレイが得られる。

【0007】しかるに、所定量のプローブ生体分子を検出スポットに固定化するためには、微小な、かつ多数の区画であるプローブ生体分子受容固相部のそれぞれに所定量のプローブ生体分子を含む溶液をスポットする必要があった。しかし、所定の位置に有るプローブ生体分子

液をスポットして、生体分子マイクロアレイを製造する方法はこれまでに知られていなかった。

【0008】そこで本発明は、所定の位置に有るプローブ生体分子受容固相部に対して精度良くプローブ生体分子を含む溶液をスポットして、各プローブ生体分子受容固相部に所定量(数量)のプローブ生体分子を固定化した生体分子マイクロアレイを製造する方法及び装置を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の通りである。

(請求項1) 表面にプローブ生体分子受容固相部を複数個有する基板を準備する工程(但し、前記各プローブ生体分子受容固相部は、プローブ生体分子を特異的にかつ定量的に受容し得る部分である)、及び前記プローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子を含む溶液をスポットし、該溶液に含まれるプローブ生体分子を前記プローブ生体分子受容固相部に固定化する工程(但し、前記溶液のスポットは、前記溶液の1つの液滴が前記1つのプローブ生体分子受容固相部の少なくともも全面を覆うように行い、かつ前記1つの液滴には1つのプローブ生体分子受容固相部が受容し得る以上の数のプローブ生体分子が含まれる)を含む、生体分子マイクロアレイの製造方法であって、前記基板は表面に基板の位置決めをするためのアラインメントマークを有し、前記プローブ生体分子受容固相部は、前記アラインメントマークとの位置関係により位置決めされており、かつ前記溶液のスポットは、前記アラインメントマークとの位置関係により位置決めされた前記プローブ生体分子受容固相部に対して行われる製造方法。

(請求項2) 前記アラインメントマークをCCDカメラにより読み取り、該読み取りによりスポット手段に基板表面のプローブ生体分子受容固相部の位置を認識させ、位置を認識させたスポット手段により、プローブ生体分子を含む溶液をスポットする請求項1に記載の製造方法。

(請求項3) 前記プローブ生体分子は、DNA、RNA、PNAまたはタンパク質であることを特徴とする請求項1または2に記載の製造方法。

(請求項4) 生体分子マイクロアレイ用基板上のアラインメントマーク読み取り用のCCDカメラ、該CCDカメラで読み取られたアラインメントマークの位置からプローブ生体分子受容固相部の位置を認識する機構、及び前記機構により位置認識されたプローブ生体分子受容固相部にスポット手段からプローブ生体分子を含む溶液をスポットさせるための位置制御機構を有するスポット機構を有するプローブ生体分子を含む溶液のスポット装置。

(請求項5) 生体分子マイクロアレイ用基板を整列させ

10

20

30

40

ットするためのチップを保持するためのチップホルダーをさらに有し、前記チップホルダーはチップホルダー位置補正回転機構(θ軸)を介して、X軸、Y軸及びZ軸の各移動装置に接続されている請求項4に記載のスポット装置。

(請求項6) チップホルダー位置補正回転機構(θ軸)近傍に基板読み取りカメラと、スタンプ観察装置とをさらに有する請求項4または5に記載のスポット装置。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の生体分子マイクロアレイの製造方法は、基板を準備する工程及び溶液をスポットする工程からなる。

[基板を準備する工程] この工程では、基板表面にプローブ生体分子受容固相部を複数個設けた生体分子マイクロアレイ用基板を準備する。但し、各プローブ生体分子受容固相部は、プローブ生体分子を特異的にかつ定量的に受容し得る部分とする。上記生体分子マイクロアレイ用基板は、例えば、基板表面のほぼ全面にわたり、プローブ生体分子を各々定量的に受容し得る複数の微細なプローブ生体分子受容固相部を規則的に設けたものであることができる。この生体分子マイクロアレイ用基板において、プローブ生体分子受容固相部は、プローブ生体分子を定量的に受容し得る部位であるが、プローブ生体分子を定量的に受容し得るようにするためには、プローブ生体分子に対する固相化剤の所定量をプローブ生体分子受容固相部に付着させる。プローブ生体分子受容固相部に付着させる固相化剤の量に応じて固定化されるプローブ生体分子の量(数量)を適宜決定することができる。即ち、プローブ生体分子受容固相部に付着させた固相化剤の量が各プローブ生体分子受容固相部において同一であれば、十分量のプローブ生体分子を各プローブ生体分子受容固相部に供給し、固定化させることで、各プローブ生体分子受容固相部に固定化されるプローブ生体分子の量(数量)を同一量とすることができる。

【0011】前記固相化剤としては、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、アミノ基、カルボニル基、硫酸基、スクシニド基、マレイド基、チオール基等の固相化能を有する官能基を有する物質を挙げることができる。固相化剤を基板に付着させる方法は後述する。特に、プローブ生体分子受容固相部は、基板表面に結合したビオチン分子の末端にアビジン分子が単層に結合したものであることができる。各プローブ生体分子受容固相部の径は、例えば、50〜2000ミクロン、各プローブ生体分子受容固相部同士の間隔は、例えば、100〜500ミクロンであることが望ましい。ここで、前記径とは、プローブ生体分子受容固相部の形状が円形の場合は直径、正方形の場合は一片の長さを意味する。尚、前記形状は、前記生体分子マイクロアレイの生体分子検出スポット部の撮像に使用する固体撮像素子の画素

化剤を付着し得る物であれば、その材質には、特に制限はない。基板としては、例えば、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金基板、銀基板等を適宜使用することができる。

【0012】上記生体分子マイクロアレイ用基板は、フォトリソグラフィ技術およびエッチング技術を用いて、基板の所定の部位にプローブ生体分子受容固相部を設けることにより製造できる。図1に基づいて生体分子マイクロアレイ用基板の製造方法を説明する。図1は、生体分子マイクロアレイ用基板の製造方法の一例を示す製造工程図である。図中の工程(9)に示す100が生体分子マイクロアレイ用基板であり、この基板100は、プローブDNAが特定の部位101のみに付着するように表面処理されている。基板100の製造工程は以下のとおりである。

(1) 基板洗浄工程：スライドガラス基板11を洗浄し不純物を取り除く。

(2) アルミニウム膜蒸着工程：スライドガラス基板11の表面に、アルミニウム膜12を蒸着(コーティング)する。

(3) フォトレジストの塗布工程：アルミニウム膜12の表面にネガ型のフォトレジストを塗布(コーティング)する。

(4) 露光工程：フォトリソマスク14を通して(3)の基板上の特定の部位101にのみ光(hv)を照射する。

(5) 現像工程：(4)の基板のフォトレジスト13を現像する。この段階で特定の部位101のフォトレジスト13が除去される。

(6) エッチング工程：(5)の基板上のフォトレジスト13が除去され、露出した部位101のアルミニウム膜をエッチングする。これにより、特定の部位101のアルミニウム膜12が除去される。

(7) レジスト除去工程：(6)の基板上のフォトレジスト13をアセトン等の溶媒により溶解して除去する。この段階で、スライドガラス基板11の表面のうち、特定の部位101のみ露出し、それ以外の表面はアルミニウム膜で被覆されている。

(8) DNA固相化膜形成工程：(7)の基板上に、プローブDNAを吸着し固相化する固相化剤を塗布し、DNA固相化膜15を形成する。この工程は、具体的には、アミノシラン処理による基板表面へのアミノ基導入工程と、ビオチンスクシニドによる基板表面のアミノ基へのビオチン導入工程とからなる。

(9) DNA付着部位形成工程：(8)の基板上のアルミニウム膜12を酸、アルカリまたはキレート剤により溶解させて除去する。この段階で、スライドガラス基板11の表面の特定の部位101にのみDNA固相化膜15が形成される。

(10) アビジン結合工程：(9)の基板上にアビジン

相化膜 15 のビオチン分子の末端にアビジン分子を単層に結合させる。

以上の (1) ~ (9) または (1) ~ (10) の工程を経ることで、スライドガラス基板 11 の表面の特定の部位 101 のみにビオチンまたはアビジンが単層に固定された DNA マイクロアレイ基板 100 が得られる。特定の部位 101 の直径は 200 ミクロン以下、特定の部位 101 同士の間隔は 500 ミクロン以下である。

【0013】図 2 に各 DNA 固相化膜 15 のビオチン分子の末端にアビジン分子が単層に結合する過程を示す。上記 (1) ~ (9) の工程を経て作成された各基板の表面に形成される特定の部位 101 の面積及び形状は、フォトマスクの透過窓の面積及び形状を均一にすることで、全て均一にすることができる。そのため、各特定の部位 101 に固定されたビオチン分子 23 の数もほぼ均一にすることができる。したがって、各特定の部位 101 に固定化されたビオチン分子 23 に結合するアビジン分子の数も、各特定の部位 101 の間で均等になる。特定の部位 101 の形状や寸法、特定の部位 101 同士の間隔は、露光工程で使用するフォトマスクを変えること
20 によって任意に変更できる。したがって、特定の部位 101 に固定するアビジン分子の数も、フォトマスクを変えることによって任意に制御できる。

【0014】生体分子マイクロアレイ用基板の製造方法は上記の実施の形態に限定されない。すなわち、図 1 に示した製造方法とは別な方法として、基板 11 の表面全体に最初から DNA 固相化膜 15 を形成し、特定の部位 101 のみ DNA 固相化膜 15 を露出させる方法を採用してもよい。この場合には、基板 11 の表面全体に DNA 固相化膜 15 およびアルミニウム膜 12 を順次積層形成した後、アルミニウム膜 12 上にボジ型のフォトレジスト 13 を積層形成し、フォトマスクを通して特定の部位 101 にのみ露光し、上記と同じように、現像とエッチングとを行うことにより、特定の部位 101 のみ DNA 固相化膜 15 を露出させることができる。また、フォトレジストはボジ型である必要はなく、ネガ型のフォトレジストも使用可能であることは無論である。

【0015】[溶液をスポットする工程] この工程では、プローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子を含む溶液をスポットし、該溶液に含まれるプローブ生体分子を前記プローブ生体分子受容固相部に固定化する。プローブ生体分子受容固相部には上述のように、所定量のプローブ生体分子に対する固定化剤を付着させてあり、十分量のプローブ生体分子を各プローブ生体分子受容固相部に供給し、固定化させることで、各プローブ生体分子受容固相部に固定化されるプローブ生体分子の量
40 (数) をほぼ同一量とすることができる。しかし、十分量のプローブ生体分子を各プローブ生体分子受容固相部に供給しなければ、固定化されるプローブ生体分子の量

れない。

【0016】そこで本発明の製造方法では、溶液のスポットは、溶液の 1 つの液滴が 1 つのプローブ生体分子受容固相部の少なくとも全面を覆うように行う。こうすることで、プローブ生体分子受容固相部の一部にプローブ生体分子が行き渡らない箇所ができないようにすること
かできる。さらに、1 つの液滴には 1 つのプローブ生体分子受容固相部が受容し得る以上の数のプローブ生体分子が含まれる。液滴が、プローブ生体分子受容固相部の全面を覆い、かつその液滴中に受容し得る以上の数の
10 プローブ生体分子が含まれていれば、プローブ生体分子受容固相部の全面にかつその能力の上限量のプローブ生体分子が固定化される。液滴中に、受容し得る数に満たないプローブ生体分子しか供給されなければ、溶液の 1 つの液滴が 1 つのプローブ生体分子受容固相部の全面を覆うようにスポットしても、プローブ生体分子受容固相部の全面にかつその能力の上限量のプローブ生体分子が固定化されることはない。

【0017】上記のように固定化が適正に進行するためには、その前提として、各プローブ生体分子受容固相部に溶液の液滴が正確にスポットされる必要がある。しかし、プローブ生体分子受容固相部のサイズは、上述のように、径は、例えば、50 ~ 200 ミクロンであり、間隔は、例えば、100 ~ 500 ミクロンである。このような微細なポイントでかつ狭い間隔の各プローブ生体分子受容固相部に各液滴を供給するために本発明では、まず、表面に基板の位置決めをするためのアラインメント
30 マークを有する基板を使用する。表面に基板の位置決めをするためのアラインメントマークを有する基板の例を図 3 に示す。この基板はスライドガラス 30 の表面に固相部 31 を有する物であり、かつ固相部 31 以外のスライドガラスの表面に 4 つのアラインメントマーク 32 を有する。アラインメントマークは、例えば、CCD カメラにより読み取られるので、現状の CCD カメラの分解能を考慮すると、図 4 に示すサイズのものであることができる。但し、CCD カメラの分解能が向上すれば、それに見合ったアラインメントマークとすることはでき
る。

【0018】さらに、本発明の製造方法に使用される基板では、各プローブ生体分子受容固相部は、アラインメントマークとの位置関係により位置決めされる。すなわち、各プローブ生体分子受容固相部は、基板表面のアラインメントマークに対して所定の位置に設けられる。上述のように本発明の製造方法に使用される基板は、フォトリソグラフィ技術およびエッチング技術を用いて、基板の所定の部位にプローブ生体分子受容固相部が設けられるため、このような精密な加工も容易に行うことができ
る。さらに、プローブ生体分子を含む溶液のスポットは、アラインメントマークとの位置関係により位置決め
40 される。すなわち、溶液の 1 つの液滴が 1 つのプローブ生体分子受容固相部の少なくとも全面を覆うように行う。

より具体的には、基板上のアラインメントマークをCCDカメラにより読み取る。そしてこの読み取りによりスポット手段が基板表面のプローブ生体分子受容固相部の位置を認識する。そして、プローブ生体分子受容固相部の位置を認識させたスポット手段、例えば、チップ

(針)により、プローブ生体分子を含む溶液をプローブ生体分子受容固相部に正確にスポットする。

【0019】基板表面の所定の位置にプローブ生体分子を含む溶液をスポットする方法及び装置は従来から知られている。スポット法には、例えば、キール法、ピンアンドリング法、インクジェットプリント法が有る。キール法は、万年筆状の針先に溶液を染み込ませてスポットする方法である。ピンアンドリング法は、リングに溶液を張り、張られた溶液の膜に針を貫通させてスポットする方法である。インクジェットプリント法は、インクジェットプリンタを応用したスポット方法である。本発明では、いずれの方法も使用できる。

【0020】本発明の製造方法は、

(1) 基板上のアラインメントマーク読み取り用のCCDカメラ

(2) CCDカメラで読み取られたアラインメントマークの位置からプローブ生体分子受容固相部の位置を認識する機構、及び

(3) (2)で位置認識されたプローブ生体分子受容固相部にスポット手段からプローブ生体分子を含む溶液をスポットさせるための位置制御機構を有するスポット機構

を有する装置を用いて実施することができる。

【0021】そのような装置の一例を図5に示す。図5は、生体分子マイクロアレイ用基板上にプローブ生体分子を含む溶液をスポットする装置51(図中、左手前)と、プローブ生体分子を含む溶液を試料プレートからスポット手段であるチップ(針)に供給するための装置52(図中、右奥)からなるDNAアレイシステム50の斜視図である。溶液をスポットする装置51には、生体分子マイクロアレイ用基板であるスライドガラス54を整列させるためのスライドガラスプールの53と溶液をスポットするためのチップ(針)を保持するためのチップホルダー55がある。チップホルダー55はチップホルダー位置補正回転機構(θ軸)56を介して、X軸57、Y軸58及びZ軸59の各移動装置に接続されている。チップホルダー位置補正回転機構(θ軸)56の並びには、スライドガラス読み取りカメラ(CCDカメラ)60と、スポッティング中にスポット状態を観察するためのスタンプ観察装置(CCDカメラ)61が設けられている。さらに、溶液をスポットする装置51とチップ(針)に試料溶液を供給するための装置52との間にチップホルダー位置読み取りセンサ63を有する。上記装置の動作について以下に説明する。まず、チップ

スポットが終了したチップをチップホルダー交換機構64により、新たに試料プレート65からプローブ生体分子を含む溶液を供給したチップに交換する。新たなチップは、溶液をスポットする装置51に固定され、チップホルダー位置読み取りセンサ63により、チップホルダー上でチップの位置を読み取る。次いで、スライドガラス読み取りカメラによりスポットするスライドガラス上のアラインメントマークを読み取り、スライドガラス上の位置及びスライドガラス上に設けられたプローブ生体分子受容固相部の位置を認識させる。そして、プローブ生体分子受容固相部に正確にスポットできるように、X軸57、Y軸58及び位置補正回転機構(θ軸)56の各移動装置を操作して位置補正(X、Y、θ方向)を行う。次いで位置補正を行ったチップホルダーに固定されたチップから各プローブ生体分子受容固相部にプローブ生体分子がスポットされる。

【0022】本発明の製造方法において、プローブ生体分子は、例えば、DNA、RNA、PNAまたはタンパク質であることができる。また、これらプローブ生体分子は、例えば、ビオチンで標識した生体分子であり、プローブ生体分子受容固相部がアビジンまたはストレプトアビジンを付着させたものであることができる。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

(定量基板の作製方法の各ステップ)

(a) スライドガラスの洗浄

Pre-Cleaned slideglass (マツナミ社、SI111)をアセトンにつけ、30分間超音波洗浄した。その後、脱イオン水により、3回交換洗浄した。次に、過酸化水素水/濃硫酸(1:1)につけ、30分間超音波洗浄した。その後、脱イオン水により、3回交換洗浄した。次に、超純水(ミリQ水)により、30分間超音波洗浄した。その後、超純水(ミリQ水)により、3回交換洗浄し、60℃のオーブンで20分間乾燥させた。

(b) アルミニウム真空蒸着

この洗浄したスライドガラスを真空蒸着装置(LULVAC社)より、アルミニウム膜を蒸着した。(膜厚は約300nmであった。)

(c) レジスト塗布

アルミニウム膜を蒸着したスライドガラスにポジ型フォトリソ(シプレー社、SI813)をのせ、スピナー(ミカサ社)により、1μmの厚みで塗布した。その後、120℃で20分間ベーキングした。

(d) 露光

レジスト塗布したスライドガラスに、DNA固相化部位のパターンが作製してあるフォトマスクを通して、DNA固相化部位の中にのみ、紫外光を露光した。この露光操作には、YAGレーザの3倍波(波長:355nm、レーザパワ

間は、最適な時間を求め、その結果、120秒（30x80mmのエリア）とした。

(e) 現象

露光後、現像液（シブレー社、CD-26）に35秒浸した後、超純水（ミリQ水）で洗浄した。その結果、紫外光が照射されたDNA固相化部位のみ、レジストは溶解し、アルミニウム膜が露出した。

(f) エッチング

レジストのパターンを作製したスライドガラスを、エッチング溶液（リン酸/酢酸/硝酸/ミリQ水（16:2:1:1））に3分間浸し、DNA固相化部位のみアルミニウム膜を溶解し、ミリQ水により洗浄した。その後、アセトンにより1次、2次、3次洗浄することでレジストのみを溶解した。

(g) アミノシランコート

1%アミノシラン溶液（3-(2-Aminoethylaminopropyl)-trimethoxysilane in 95% アセトン）に10分間浸した。その後、結合していないアミノシランを洗浄するために、アセトンにより、10分間、3回洗浄した。次に、110°Cのオーブンで40分間乾燥させた。乾燥後、室温まで自然放置した。

(h) ビオチン化反応

次に、5mg/ml ビオチン-Long arm-NHS溶液（in 0.05M NaHCO₃, pH 8.6）に室温で4時間浸した。その後、ミリQ水で洗浄した後、真空乾燥した。

(i) リフトオフ

残っているアルミニウム膜を溶解するために、エッチング溶液に超音波をかけながら3-5分間浸し、その後、超純水（ミリQ水）に超音波をかけながら30分間浸した。この操作により、アルミニウム膜が溶解するとともに、その上のビオチン化膜も物理的に剥離した。その結果、DNA固相化部位のみ、ビオチン化膜が形成された。

(j) アビジン結合反応

次に、0.1mg/ml アビジン溶液（Cy3 labeled streptavidin, Vector社、Buffer: 1xSSPE, pH 7.3）をビオチンのパターンが形成されたスライドガラスにのせ、室温で30分間静置した。その後、1xSSPE（pH 7.3）バッファで10分間2回洗浄した。次に、超純水（ミリQ水）で5回交換洗浄し、真空乾燥した。このようにして、DNA固相化部位にアビジンが結合した定量基板が完成した。

【0024】表面処理基板上のプローブ生体分子受容固相部（特定の部位）にスポットする溶液中のDNA量（濃度）と特定の部位に固定化されるDNA量との関係の測定例を示す。図6にこの測定結果から、 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 個のプローブDNAをスポットすれば特定の部位に固定化されるプローブDNA量が一定になることがわかる。

【0025】（スポットティング方法）図5に示すスポッ

トスライドガラスにスポットする装置と、試料溶液をスポットするチップ（針）を洗浄し、乾燥させて試料を試料プレートから採取する装置とから構成され、スポット動作と試料採取等の動作を並列に行うことにより、試料採取等の時間はスポット時間に加算されない特長を有している。このため2台のチップホルダーを設け、チップホルダー交換機構によりスポットする装置と試料採取等の装置間でチップホルダーの交換を行う。

【0026】（試料採取等を行う装置）

a) 試料採取等

チップホルダー待機位置に位置してあるチップを試料ホルダー交換機構にて移動させ、チップの超音波洗浄、流水洗浄、乾燥を行い試料プレートから試料を採取して、再びチップホルダー待機位置に位置する。

（スポットする装置）

a) スライドガラス位置認識

スライドガラスのアライメントマークを読み取りスライドガラスの位置を認識する。

b) チップホルダー交換

スポットが終了したチップを試料ホルダー交換機構によりスポット側装置より取外し、チップホルダー待機位置まで移動させ位置し、既に位置してある新たな試料の供給されたチップを試料ホルダー交換機構により移動させスポット側装置に取付ける。

c) チップホルダー位置認識・位置補正

チップホルダー位置読み取りセンサーにてチップホルダーの取り付け位置を読み取り、位置補正を行う。（X、Y、θ）

d) スポット

30 各々のスライドガラスに対し、それぞれチップホルダーの位置補正（X、Y、θ）を行い、スポットを行う。上記方法でスポットを行い、生体分子マイクロアレイが製造される。

【0027】

【発明の効果】本発明によれば、所定の位置に有るプローブ生体分子受容固相部に対して精度良くプローブ生体分子を含む溶液をスポットして、各プローブ生体分子受容固相部に所定量（数量）のプローブ生体分子を固定化した生体分子マイクロアレイを製造する方法及び装置を提供することができる。本発明の方法により得られるDNAマイクロアレイ上のDNA検出スポット部は、全て同一形状、同一面積であり、しかも全検出スポット部に同数ずつプローブDNAが固定されているので、このDNAマイクロアレイによれば定量的な解析が可能になる。DNAマイクロアレイ上におけるDNA吸着部位が特定の部位すなわちDNA検出スポット部のみに制限されるので、DNA検出スポット部の周囲にDNAが非特異的に吸着を起こすのを防止できる。したがって、蛍光検出時のノイズ（不要光）の減少により、S/N比を向上させ、

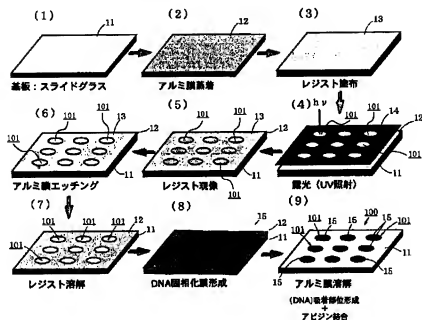
状すなわち前記特定の部位の形状を、撮像に使用する固体撮像素子（CCDセンサ、CMOSセンサなど）の画素の形状と一致させておくことにより、S/N比をより向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

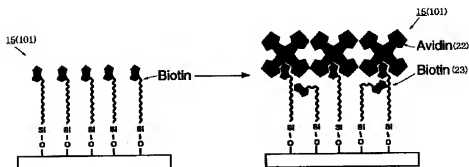
【図1】生体分子マイクロアレイ用基板の製造方法の一例を示す製造工程図。

【図2】各DNA固相化膜15のビオチン分子の末端にアビジン分子が単層に結合する過程を示す図。 *

【図1】



【図2】



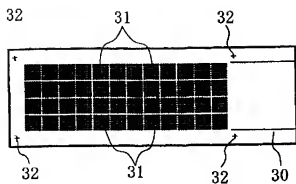
* 【図3】表面に基板の位置決めをするためのアラインメントマークを有する基板の例を示す図。

【図4】アラインメントマークの一例を示す図。

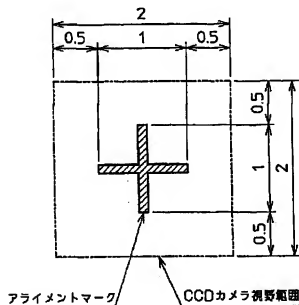
【図5】本発明のスポット装置の一例を示す図。

【図6】表面処理基板上のブロープ生体分子受容固相部（特定の部位）にスポットする溶液中のDNA量（濃度）と特定の部位に固定化されるDNA量との関係の測定結果を示す図。

【図3】



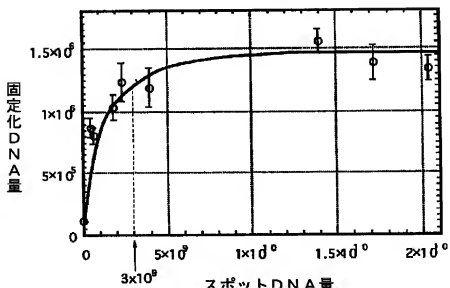
【図4】



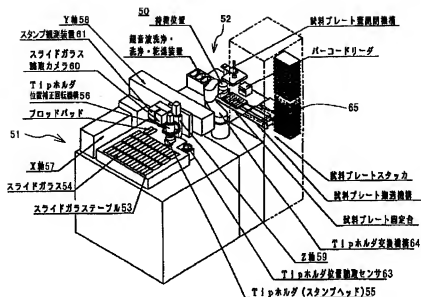
CCDカメラにおける
位置検出分解能

視野2mm×2mmにて
2 μ m

【図6】



【図5】



フロントページの続き

- (72) 発明者 橋内 徳司
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内
(72) 発明者 近藤 恭光
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内

- (72) 発明者 白井 武樹
東京都品川区西五反田 3 丁目 11 番 6 号 テ
イエチケー株式会社内
(72) 発明者 中澤 東治
東京都品川区西五反田 3 丁目 11 番 6 号 テ
イエチケー株式会社内
(72) 発明者 飯村 彰浩
東京都品川区西五反田 3 丁目 11 番 6 号 テ
イエチケー株式会社内